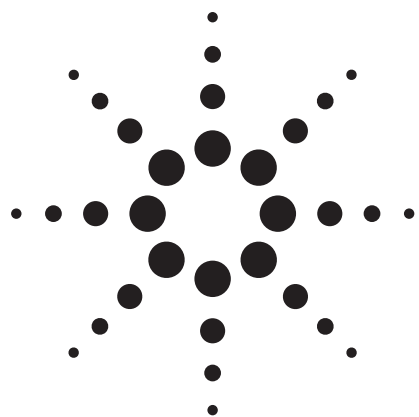




2 μm 未満の粒子カラムを使用した 高速および超高速分析

Agilent 1100シリーズLCシステムと、 Agilent 1200シリーズラピッドレゾリューション LCシステムの比較

アプリケーション

A. G. Huesgen

要約

多くの分析研究室で作業負荷が増え続けているため、分析メソッドをより速く作成する必要が生じています。HPLC用のメソッドをより速く作成することが、最先端LC機器の受け入れに必要な条件となってきました。従来型 LC 機器も高速メソッドを提供できますが、幅広い圧力/温度範囲と、一般的に内径 4.6 mm カラムより低流量が使用される場合には、主に内径 2.1 mm カラムを用いた低デッドボリュームの専用 LC システムにより、優れた性能と時間節約が実現されます。Agilent 1200 シリーズラピッドレゾリューション LC (RRLC) システムを使用すると、短い実行時間、短い平衡時間が可能になり、その結果、サイクル時間の短縮とサンプル処理数の増加を図ることができます。



Agilent Technologies

緒言

多くの分析研究室で作業負荷が増え続けているため、分析メソッドをより速く作成するニーズが生じています。さらに、標準カラム用のメソッドを速く作成することが重要です。ますます多くのアプリケーションが LC/MS システムを使用して行われるため、大部分の MS エンジンに完全適合するように、ナローボアカラムを使用する需要も存在します。内径 2.1 mm 以下のナローボアカラムは、低ディレイボリウムとカラム前後の拡散容量に関して高い需要を持っています。以下の実験ではその一例が示されており、最先端機器の高い圧力/温度リミット値を活用しながら、LC システムでどのくらい速くメソッドを作成できるかを示しています。さらに、1.8 μm 粒子充填内径 4.6 mm カラムと内径 2.1 mm を使用して、従来型の Agilent 1100 シリーズ LC システムと Agilent 1200 シリーズラピッドレゾリューション LC システムのスピードと性能の比較を行いました。

実験

Agilent 1200 シリーズ RRLC システムでは以下のモジュールを使用しました。

- 最長 150 mm、内径 2.1 ~ 4.6 mm の 1.8 μm 粒子カラムを使用したアプリケーション用のデガッサ付き Agilent 1200 シリーズバイナリポンプ SL
- 高い面積精度用の Agilent 1200 シリーズ高性能オートサンブラ SL
- 周囲温度 -10 °C ~ 最高 100 °C の幅広い温度範囲を持つ Agilent 1200 シリーズカラムコンパートメント SL
- 80 Hz 操作用 Agilent 1200 シリーズダイオードアレイ検出器 SL (新型データ保護ツールを含む)
- さまざまな内径、長さ 50 mm、1.8 μm 粒子充填 ZORBAX SB C-18 カラム
- 内径 2.1 mm カラム (Agilent 部品番号 G1316-68744) 用最適条件用低拡散キット

Agilent 1100 シリーズ LC システムは以下のモジュールと共に使用されました。

- デガッサ付き Agilent 1100 シリーズバイナリポンプ
- Agilent 1100 シリーズウェルプレートオートサンブラ
- Agilent 1100 シリーズカラム恒温槽
- Agilent 1100 シリーズダイオードアレイ検出器 B
- 内径 2.1 mm カラム (Agilent 部品番号 G5065-9947) 用最適条件用低拡散キット

結果と考察

過去には、高速および超高速分析に Agilent 1100 シリーズ LC システムが使用されました¹。この装置は、1.8 μm 粒子充填の短い内径 4.6 mm カラムを使用した化合物の分析や、1 分以内の実行時間の分析に特に適しています。2 分以内のサイクル時間が達成されました。Agilent 1200 シリーズ RRLC システムは、幅広い圧力/温度範囲、低システムディレイボリウム、および DAD システム用ノイズ改良を備えた新開発 LC システムです。これらの向上により、特に内径 2.1 mm のカラムに対して、Agilent 1100 シリーズ LC システムと比較してスピードと性能が向上しました。

内径 4.6 mm カラムを使用した実験

両装置は、ミキサーと内径 0.17 mm フローキャピラリーが設置された標準コンフィグレーションでセットアップされました。通常、同じパラメータを使用して、スピードと分解能に関して LC メソッドを最適化できます。このパラメータは、流量、カラム温度、グラジエントプロフィール、そしてサンプルがカラムの上部に達した後の流路からのオートサンプリングディレイボリュームの切り替え (ADVR = 自動ディレイボリューム削減) といった、その他の装置固有のパラメータです。高速メソッドをどのように作成できるかについての典型的な例が図 1 になります。目的は、高速サイクル時間とすべてのピークに対して分離度 2 以上を実現することです。

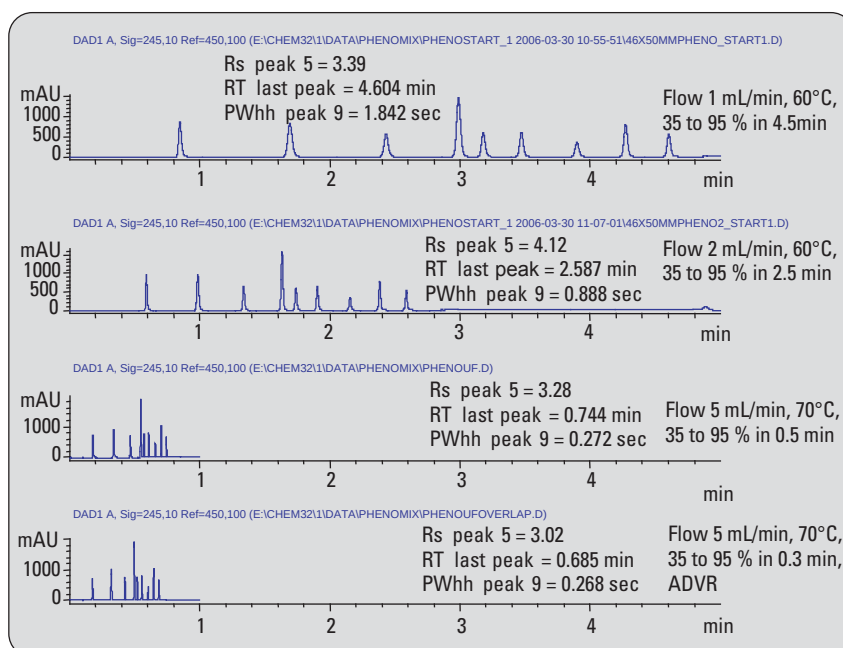


図 1

超高速 LC メソッドのメソッド作成。

クロマトグラフ条件:

テストサンプル: 9 種の化合物の組み合わせで、各 100 ng/μL、水/アセトニトリル (65/35) に溶解 1. アセトアニリド、2. アセトフェノン、3. プロピオフィェノン、4. ブチロフェノン、5. ベンゾフェノン、6. バレロフェノン、7. ヘキサノフェノン、8. ヘプタノフェノン、9. オクタノフェノン

カラム: 50 x 4.6 mm ZORBAX SB C-18、60 MPa 操作用 1.8 μm

ポンプ: 溶媒 A: H₂O + 溶媒 B: アセトニトリル
グラジエント: さまざまなプロファイルを使用した 35 ~ 95% の溶媒 B

オートサンブラ: 注入量: 1 μL
ニードル外側を 5 秒間洗浄
フラッシュアウトファクタ 20

カラム恒温槽: 温度: さまざまな温度

ダイオードアレイ検出器 B とダイオードアレイ検出器 SL: シグナル: 245/10 nm Ref 450/100 nm

両システムでの上記パラメータのすべての最適化により、図 2 に示したクロマトグラムが得られました。Agilent 1100 シリーズ LC システムの圧力限度は 40 MPa であるため、最高流量が制限されます。カラム温度が 80 °C に設定されても 5 mL/min の流量は不可能で、これが 1100 シリーズカラム恒温槽の上限値です。Agilent 1200 シリーズ RRLC システムは、最高 60 MPa、100 °C で操作できます。高温条件下では 5 mL/min でも圧力リミット値の 60 MPa に達しません。さらに設計変更により、Agilent 1200 シリーズ DAD SL のノイズレベルは、Agilent 1100 シリーズ DAD B と比較して大幅に向上しました。両装置の性能は表 1 のとおりです。

分離能とノイズは Agilent 1200 シリーズ RRLC システムで改善された一方、実行時間とサイクル時間は同程度です。ポストカラム冷却装置を使用して、1200 シリーズ RRLC システムのノイズレベルをさらに下げることができます²。この装置により、カラム溶出ガスの温度が光学ユニットの温度に合わされます。特に高流量や高温が使用される場合、ノイズレベルを下げます。オーバーラップ注入により、サイクル時間をさらに削減できます。

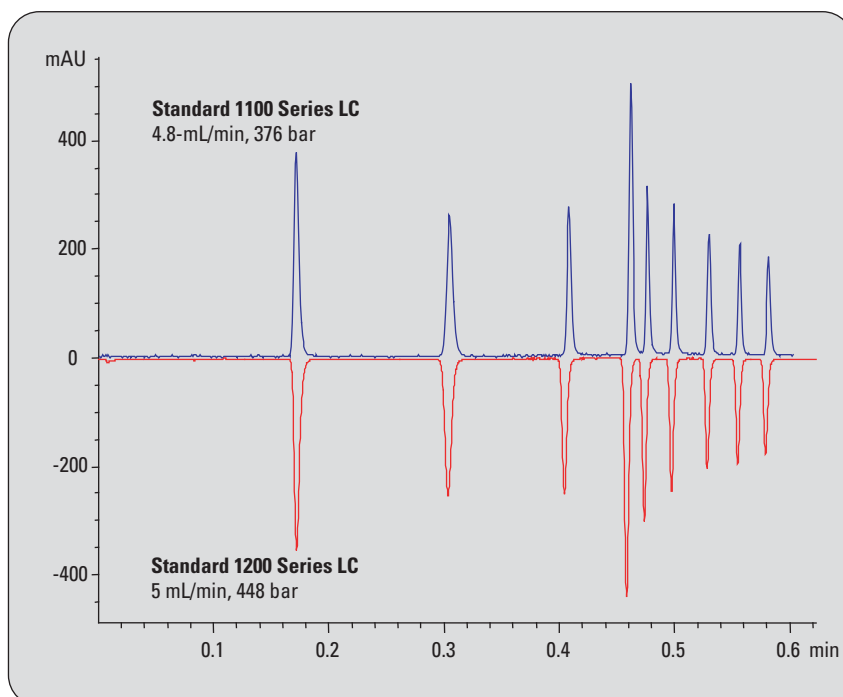


図 2
標準 Agilent 1200 シリーズ RRLC システム vs. Agilent 1100 シリーズ LC システム：
1.8 μ m 粒子充填、内径 4.6 mm カラムでフェノール混合物の分析。

クロマトグラフ条件:

テストサンプル: 9 種の化合物の組み合わせで、各 100 ng/ μ L、水/アセトニトリル (65/35) に溶解 1. アセトアニリド、2. アセトフェノン、3. プロピオフェノン、4. ブチロフェノン、5. ベンゾフェノン、6. バレロフェノン、7. ヘキサノフェノン、8. ヘプタノフェノン、9. オクタノフェノン
カラム: 50 x 4.6 mm ZORBAX SB C-18、60 MPa 操作用 1.8 μ m
ポンプ: 溶媒 A: H_2O 、溶媒 B: アセトニトリル
グラジエント: 0.3 分で溶媒 B が 35 ~ 95%
オートサンブラ: 注入量: 1 μ L
ニードル外側を 5 秒間洗浄、フラッシュアウトファクタ 20
カラム恒温槽: 温度: 80 °C
検出器 DAD B および DAD SL: シグナル: 245/10 nm Ref 450/100 nm

パラメータ	標準 1100 シリーズ 80 °C 4.8 mL/min	標準 1200 シリーズ 80 °C 5 mL/min
流量	4.8 mL/min	5 mL/min
実行時間	0.60 分	0.60 分
サイクル時間	1 分 37 秒	1 分 37 秒
Rs ピーク 5	2.22	2.30
半値幅ピーク 9	0.00378 分	0.00375 分
半値幅ピーク 1	0.00458 分	0.00486 分
ノイズ PtoP	6.2021 mAU	0.7930 mAU
背圧	37.6 MPa	44.8 MPa
注入量	1 μ L	1 μ L
DAD 取込速度	20 Hz、光路長 10 mm	80 Hz、光路長 10 mm

表 1
内径 4.6 mm カラムの性能比較。

また、オープンにカラム切換バルブを設置でき、これにより分析にカラムを2本使用してさらに多くのサンプルを処理できます。サンプルは1番目のカラムで分析され、その間に2番目のポンプを使用して2番目のカラムが再生されます。1番目のカラムの分析が完了すると、予め平衡になった2番目のカラムで次の注入をすぐに行えます。

内径 2.1 mm カラムを使用した実験

内径 2.1 mm 以下のカラムには、カラム前後の低いディレイボリュームと拡散容量に関する高い必要があります。内径 2.1 mm のカラムを使用する場合、ミキサーをはずすか、著しく小容量のミキサに交換して、Agilent 1100 シリーズバイナリ LC システムを最適化する必要があります。1.8 μm 、長さ 50 mm のカラムを使用して、2 分以内のサイクル時間をかろうじて実現できました。これは、主に Agilent 1100 シリーズ LC システムの圧力リミットが 40 MPa であるためです。さらに、1100 シリーズ LC システムのディレイボリュームは高速分析と平衡時間の障害となります。Agilent 1200 シリーズ RRLC システムの導入で、この格差は埋まりました。今では、1.8 μm 粒子充てんナローボアカラムを使用して、高流量および高温で実行時間を 0.5 分以内にできます。同じカラムと最適化された装置コンフィグレーションを使用して、両システムが比較されます。両システムに条件を最適化できるようにするため、以下の設定を行いました。

Agilent 1100 シリーズ LC システムのコンフィグレーション:

- ミキサーは内径 0.12 mm の短いキャピラリー (Agilent 部品番号 G1312-67301) に交換されました。
- シートとシートキャピラリーは内径 0.12 mm の部品 (ウェルプレートシート (Agilent 部品番号 G1367-87104) とシートキャピラリー (Agilent 部品番号 G1313-87103)) に交換されました。
- インジェクタからカラム恒温槽までのキャピラリーは、内径 0.12 mm のキャピラリー (Agilent 部品番号 01090-87610) に交換されました。
- カラム恒温槽からカラムまでの内径 0.17 mm のキャピラリーは、内径 0.12 mm のキャピラリー (Agilent 部品番号 G1316-87303) に交換されました。
- カラムは、カラムインレットキャピラリーを使用して検出器に接続されました。
- 検出器セルとして、光路長 6 mm の 1.7 μL セルが使用されました。

Agilent 1200 シリーズ RRLC システムのコンフィグレーション:

- ポンプ用の低ディレイボリュームコンフィグレーションは、120 μL のディレイボリュームにセットアップされました (ミキサーとダンパは流路から外されました)。
- 2 本のフローキャピラリーは、Agilent 1200 シリーズ低拡散キット (Agilent 部品番号 G1316-68744) にすべて含まれている内径 0.12 mm のキャピラリーに交換されました。
- シートキャピラリーも内径 0.12 mm のキャピラリー (Agilent 部品番号 G1316-68744 のキットに含まれる) に交換されました。
- 光路長 3 mm の DAD SL 2 μL フローセルが使用されました。インレットキャピラリーはカラム出口に直接、接続されました。

両システムで同じ 2.1 x 50 mm のカラムを使用しました。流量は、背圧が各システムのリミット値に近くなるように設定されました。両システムのインジェクタセットアップ画面で、自動ディレイボリューム削減 (ADVR) が選択されました。1200 シリーズ 2 μL フローセルの短い光路長を補正するため、注入量は Agilent 1100 シリーズ LC システムは 1 μL 、Agilent 1200 シリーズ RRLC システムに 2 μL が設定されました。

図 3 には、両システムから得られたクロマトグラムの重ね書きが示されています。表2 には、両システムの性能が記録されています。

図 3 のクロマトグラムは、1.8 μm 粒子充填、内径 2.1 mm のカラムを使用した Agilent 1200 シリーズ RRLC の優位性を示しています。高流量も Agilent 1200 シリーズ RRLC システムで実現することで、実行時間とサイクル時間をさらに短くすることが可能です。表 2 では、Agilent 1200 シリーズ RRLC システムのサイクル時間が、Agilent 1100 LC システムのほんの半分であることを示しています。さらに、5 番目に大きなピークの分解能とピークの半値幅も、高流量で大幅に向上されます。

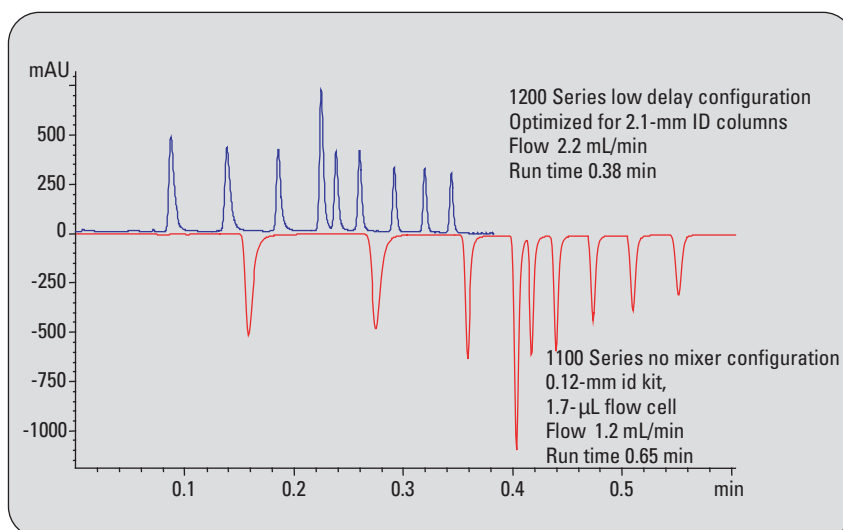


図 3
両システムに自動ディレイボリューム低減を使用して、最適化された Agilent 1200 シリーズ RRLC システムと最適化された Agilent 1100 シリーズ LC システムに内径 2.1 mm カラムを使用して行った分析。

クロマトグラフ条件:

テストサンプル: 9 種の化合物の組み合わせで、各 100 ng/ μL 、水/アセトニトリル (65/35) に溶解 1. アセトアニリド、2. アセトフェノン、3. プロピオフェノン、4. ブチロフェノン、5. ベンゾフェノン、6. バレロフェノン、7. ヘキサノフェノン、8. ヘプタノフェノン、9. オクタノフェノン
カラム: 50 x 2.1 mm ZORBAX SB C-18、60 MPa 操作用 1.8 μm
ポンプ: 溶媒 A: H_2O 、溶媒 B: アセトニトリル
グラジエント: 0.3 分で溶媒 B が 35 ~ 95%
オートサンブラ: 注入量: 1 および 2 μL
ニードル外側を 5 秒間洗浄、フラッシュアウトファクタ 20
カラム恒温槽: 温度: 80 および 95 $^{\circ}\text{C}$
検出器 DAD B および DAD SL: シグナル: 245/10 nm Ref 450/100 nm

パラメータ	1100 シリーズ、最適化済み、ミキサーなし、ADVR、80 $^{\circ}\text{C}$	1200 シリーズ、最適化済み、低ディレイボリュームコンフィグレーション、ADVR、95 $^{\circ}\text{C}$
流量	1.2 mL/min	2.2 mL/min
実行時間	0.65 分	0.38 分
サイクル時間	2 分 33 秒	1 分 16 秒
R_s ピーク 5	1.86	2.15
半値幅ピーク 9	0.00556 分	0.00328 分
半値幅ピーク 1	0.00729 分	0.0049 分
ノイズ PtoP	0.1 mAU	0.2 mAU
背圧	37 MPa	57 MPa
注入量	1 μL	2 μL
DAD 取込速度	20 Hz、光路長 6 mm	80 Hz、光路長 3 mm

表 2
内径 2 mm カラムを使用した性能比較。

結論

高速 LC メソッド用のメソッドを迅速に作成することは、最先端の LC 機器に必要な要件です。従来型の LC 機器も高速メソッドを提供できますが、幅広い圧力と温度範囲を持つ特別設計のシステムでは高性能と時間節約を実現できます。内径 4.6 mm のカラムよりも低流量が使用される内径 2.1 mm のカラムを主に使用することで、Agilent 1200 シリーズ RRLC システムは非常に小さいディレイボリュームになります。短い実行時間と短い平衡時間、その結果としてサイクル時間の短縮と、サンプル処理数の増加が可能になります。

参考文献

1. Anabel Fandino, “Ultra-fast liquid chromatography using the Agilent 1100 Series HPLC system and 1.8-um ZORBAX SB C18 Rapid Resolution HT columns”, *Agilent Application Note, publication number 5989-1603EN*, **2004**.
2. A.G.Hüsken, “Agilent 1200 Series column compartment SL with temperature control up to 100 °C and post-column cooling for lowest baseline noise”, *Agilent Application Note, publication number 5989-5034EN*, **2006**.

Angelika Gratzfeld-Huesgen はドイツ
Waldbronn のAgilent Technologies のア
プリケーションケミストです。

www.agilent.com/chem/1200rr

Agilent は、本資料に誤りが発見された場合、また、本資料の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。また、本資料掲載の機器類は薬事法に基づく登録を行っておりません。

本資料に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

著作権法で許されている場合を除き、書面による事前の許可なく、本資料を複製、翻案、翻訳することは禁じられています。

© Agilent Technologies, 2006

October 1, 2006
5989-5672JAJP



Agilent Technologies